

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
17 juillet 2003 (17.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/057885 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C12N 15/49, 5/10, C07K 14/16,
16/10, A61K 39/21, G01N 33/53, 33/566

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** etc.;
Grosset-Fournier & Demachy Sarl, 54, rue Saint-Lazare,
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00051

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 9 janvier 2003 (09.01.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/00319 11 janvier 2002 (11.01.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; 376, chemin de l'Orme,
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **GUIL-
LON, Christophe** [FR/FR]; 4, Paul Gauguin, F-69500 Bron
(FR). **CHEDAL-BORNU, Aurélie** [FR/FR]; 50, route du
Viéran, F-74370 Metz-Tessy (FR). **VERRIER, Bernard**
[FR/FR]; Chemin du Granit, La Pavière, F-69440 Mornant
(FR). **MANDRAND, Bernard** [FR/FR]; 21, rue de la
Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HIV-1 VIRUS TAT-PROTEIN MUTANTS

(54) Titre : MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

(57) Abstract: The invention relates to the use of a protein mutation method for preparing detoxified and immunogenic mutants of the wild-type HIV-1 virus Tat-protein. The invention also relates to a method for preparing detoxified and immunogenic mutants of the wild-type HIV-1 virus Tat-protein, comprising a first step in which wild-type Tat-protein mutants are prepared, a second step in which detoxified mutants having no transcellular activity but an altered nuclear localization are screened, and a third step in which immunogenic mutants capable of inducing antibodies directed against both said mutants and the wild Tat protein are screened. Steps two and three are reversible.

(57) Abrégé : L'invention concerne notamment l'utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage du virus VIH-1. L'invention concerne également un procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage, l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

WO 03/057885 A1

MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

5 La présente invention a pour objet des mutants de la protéine Tat du virus VIH-1 et une composition pharmaceutique, notamment un vaccin, comprenant au moins un desdits mutants.

10 Le virus VIH est l'agent étiologique du SIDA. Le VIH appartient à la famille des rétrovirus humains (Retroviridae) et à la sous-famille des lentivirus. Parmi les deux types de VIH (VIH-1 et VIH-2), le VIH-1 est le plus cytopathique et le plus prévalent dans le monde entier, en particulier dans les pays occidentaux. L'infection par VIH-1 est accompagnée d'un dysfonctionnement immunitaire précoce chez les êtres humains infectés par le virus.

15 Comme les autres rétrovirus, VIH-1 a des gènes qui codent pour des protéines structurelles du virus. Le gène *gag* code pour la protéine qui forme le core du virion, incluant l'antigène p24. Le gène *pol* code pour les enzymes responsables de la transcription inverse (transcriptase inverse) et de l'intégration (intégrase). Le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe. Toutefois VIH-1 est plus complexe que les autres rétrovirus et contient six autres gènes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*) qui codent
20 pour des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes du virus. Le génome du VIH-1 comprend également les LTR 5' et 3' (Long Terminal Repeat) qui comprennent des éléments de régulation impliqués dans l'expression des gènes du virus.

25 *In vivo*, Tat est une protéine nécessaire pour la réplication du VIH-1. La ou les fonction(s) de Tat dans la transcription ont grandement été étudiée(s) et il est maintenant à peu près clair qu'un des rôles principaux de Tat est la régulation de la transcription à partir du LTR 5'. Tat est un activateur de la transcription par trans-activation du LTR 5', via sa fixation à la séquence TAR en même temps qu'à d'autres facteurs cellulaires, avec pour résultante une augmentation de la transcription virale et de l'élongation. La trans-activation du LTR par la protéine Tat est essentielle à la fois pour l'expression des
30 gènes et la réplication du virus. La trans-activation du promoteur viral par la protéine Tat (17,18) permet la production à grande échelle d'ARN messagers viraux dont le transfert dans le cytoplasme est sous la dépendance d'une autre protéine de régulation,

la protéine Rev. Tat et Rev régulent l'expression du VIH-1 (7). La protéine Tat est sécrétée par les cellules infectées par le VIH-1. Une fois à l'extérieur de la cellule, elle est capable d'être internalisée par des cellules voisines (9, 14), infectées ou non, pouvant ainsi induire des modifications de l'état d'activation de lymphocytes T non infectés. Elle est donc directement impliquée dans la progression du SIDA et probablement dans des pathologies associées au SIDA, comme le sarcome de Kaposi.

La protéine Tat complète est composée de 101 acides aminés, les résidus 1-72 étant codés par un premier exon et les résidus 73-101 étant codés par un deuxième exon. La protéine Tat est fortement conservée. Une forme tronquée de 86 acides aminés, qui ne correspond pas à la forme native, existe dans quelques souches de laboratoire obtenues après passages en culture. Cette forme tronquée est due à l'introduction d'un codon stop à la position 87 pendant les passages en culture, mais plus de 90% des protéines Tat étudiées maintiennent la configuration de 101 acides aminés. Bien que les acides aminés 87-101 pourraient ne pas contribuer grandement à la propagation *ex vivo*, leur conservation dans les isolats naturels de VIH-1 qui se répliquent est une indication de leur importance biologique. La protéine Tat native de VIH-1 de 101 acides aminés est composée de cinq domaines physiques, mais le mécanisme moléculaire par lequel elle agit n'est pas encore complètement élucidé. Brièvement, ces cinq domaines sont décrits dans la publication de Jeang, K. T et al. (18). Dans cette publication, le domaine 1 correspond aux acides aminés 1-20 riches en résidus acides, le domaine 2 correspond aux acides aminés 21-40 riches en résidus cystéine (7 résidus cystéines parmi lesquels 6 sont très fortement conservés), le domaine 3 correspond aux acides aminés 41-48 qui contient le motif RKGLGI commun à VIH-1, VIH-2 et SIV, le domaine 4 correspond aux acides aminés 49-72 et contient un motif basique RKKRRQRRR et le domaine 5 correspond aux acides aminés 73-101 et comprend un motif RGD. Le rôle du domaine 1 n'est pas encore élucidé. Il a seulement été montré que des changements d'un seul acide aminé au niveau de ce domaine étaient bien tolérés et n'altéraient pas la fonctionnalité de la protéine Tat. Une hypothèse émise est que le domaine 1 pourrait être impliqué dans la trans-activation. Le changement de six cystéines parmi les sept dans le domaine 2 abolit la fonctionnalité de la protéine Tat. Ce domaine est important pour la transactivation. Le rôle du domaine 3 n'est pas élucidé. Le domaine 4 confère les propriétés de fixation de Tat à l'ARN TAR et est important pour la localisation

nucléaire ainsi que pour le transport transcellulaire de la protéine Tat. Le domaine 5 serait également impliqué dans le transport transcellulaire de la protéine Tat.

Dans la description détaillée de l'invention qui va suivre, les présents inventeurs sont partis de la séquence de la souche ACH320.2A.2.1 (n° d'accèsion NCBI U34604) et ont affiné la notion de domaines telle que donnée dans la publication de Jeang, K.T et al. (18). Ainsi et en référence à cette souche particulière, dans la présente invention le domaine 1 correspond aux acides aminés 1-21 (rôle non élucidé), le domaine 2 correspond aux acides aminés 22-37 (impliqué dans la trans-activation), le domaine 3 correspond aux acides aminés 38-48 (rôle inconnu) et le domaine 5 correspond aux acides aminés 73-101 (transport transcellulaire). Dans le domaine 4 correspondant aux acides aminés 49-72, c'est le peptide 49-57 qui est important pour la fixation à l'ARN TAR, pour la localisation nucléaire et pour le transport transcellulaire de Tat (18).

La mise au point d'un vaccin contre le VIH-1 est attendue au niveau mondial. Chez les patients infectés par le VIH-1, une réponse immune contre Tat et Rev est seulement détectée chez les personnes pour lesquelles l'infection ne progresse pas en SIDA. (26). Plusieurs études de vaccination utilisant Tat et/ou Rev dans le modèle animal VIS ont montré une protection partielle ou complète contre l'infection (4-6, 21). Cependant, la transposition directe de ces protocoles de vaccination chez l'homme n'est pas possible. Il a entre autres été montré que Tat a des effets toxiques *in vitro* (19, 22). Ces effets toxiques comprennent (i) la dérégulation de signaux cellulaires impliqués dans l'apoptose (28, 30), (ii) la dérégulation de l'expression de parties de gènes du système immunitaire tel que le gène codant pour l'interleukine-2 (29), ou de gènes codant pour les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I (16), et/ou (iii) l'induction d'angiogénèse (1, 2, 20). La protéine Tat doit donc être détoxifiée avant d'être utilisée comme antigène vaccinal. Une équipe a choisi de détoxifier la protéine Tat par inactivation chimique (10). Cependant, une telle inactivation ne peut être effectuée que dans l'optique de l'utilisation de protéines recombinantes comme antigènes vaccinaux. Afin de pouvoir utiliser la protéine Tat sous forme d'acide nucléique dans un vecteur recombinant, vivant ou non, seule une détoxification génétique pourra être envisagée. Les présents inventeurs ont donc choisi d'explorer cette voie pour la détoxification de la protéine Tat, par mutagenèse dirigée,

pour permettre son utilisation à la fois comme sous-unité protéique vaccinale et/ou comme une partie d'un vecteur de vaccination.

La présente invention concerne l'utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage.

Par "mutants" de la protéine Tat de type sauvage, on désigne les mutants obtenus par substitution ou remplacement d'un ou plusieurs acides aminés.

Par "mutants détoxifiés de la protéine Tat de type sauvage", on désigne une protéine Tat ne présentant plus les effets toxiques suivants :

- lorsqu'elle est sécrétée par une cellule infectée, la protéine Tat est toxique sous forme exogène sur les cellules non infectées par le VIH-1, par sa capacité à induire une signalisation cellulaire par fixation à des récepteurs de surface, et sa capacité à être internalisée par des cellules non infectées et transportée vers le noyau de la cellule cible ;

- de façon exogène et endogène, la protéine Tat va se localiser dans le noyau de la cellule cible et induire la régulation de l'expression de gènes cellulaires, pouvant impliquer les propriétés transactivatrices ou le domaine 5 de la protéine Tat.

Par "mutants immunogènes de la protéine Tat de type sauvage", on désigne un mutant capable d'induire la production d'anticorps après injection à un animal modèle, ces anticorps ayant la capacité de réagir à la fois avec le mutant de la protéine Tat mais aussi avec la protéine Tat sauvage.

L'invention concerne également un procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de préparation de mutants de la protéine Tat de type sauvage, notamment par mutation de l'acide nucléique codant pour la protéine Tat de type sauvage,

- une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et éventuellement par une absence d'activité transactivatrice, et

- une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage,

l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

L'absence d'activité transcellulaire également désigne une absence de transport transcellulaire et peut être détectée dans une lignée cellulaire établie par l'absence d'activation du promoteur viral de la construction LTR-gène rapporteur, par exemple celui de la Chloramphenicol Acetyl-Transférase (CAT), dont l'expression est sous la dépendance du promoteur viral (LTR) dans une lignée cellulaire établie (31), après mise en contact de ces cellules avec un mutant de la protéine Tat produit de façon exogène, par exemple par une autre lignée cellulaire que celle contenant le gène rapporteur sous la dépendance du LTR viral (32).

L'altération de la localisation nucléaire peut être définie comme la présence de la protéine Tat dans le compartiment cytoplasmique de cellules transfectées par des acides nucléiques codant pour les mutants de la protéine Tat sauvage, par exemple dans les 72 heures suivant la transfection, et peut être détectée soit par microscopie optique après transfection de lignées cellulaires par les acides nucléiques codant pour les mutants de la protéine Tat par des techniques d'immunomarquage du produit de ces gènes, soit par la détection après transfection du produit de la traduction d'acides nucléiques contenant le gène codant pour un mutant de Tat fusionné au gène codant pour une protéine autofluorescente comme la protéine EGFP (33, 34).

L'absence d'activité transactivatrice correspond à l'absence d'activation du promoteur viral et peut être détectée par l'absence d'expression d'un gène rapporteur, par exemple celui de la Chloramphenicol Acetyl-Transférase (CAT), dont l'expression est sous la dépendance du promoteur viral (LTR) dans une lignée cellulaire établie, après transfection de cette lignée par des acides nucléiques codant pour les mutants de la protéine Tat sauvage (31).

L'invention concerne également un mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage, et en ce que, lorsque la mutation est dans la région du domaine 4, elle est dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57, et en ce que, lorsque la mutation est dans le domaine 5, elle est soit dans le motif RGD, soit dans la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92, les mutations étant des mutations par substitution d'un acide aminé par un autre.

Un mutant avantageux selon la présente invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

L'invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation additionnelle susceptible de conférer une perte de l'activité transactivatrice de la protéine Tat de type sauvage.

Une protéine Tat utilisable comme antigène de vaccination devra donc remplir le plus grand nombre des critères suivants :

- abrogation de l'effet transcellulaire de Tat (domaine 4 et/ou 5)
- altération de la localisation nucléaire de Tat (domaine 4)
- perte de l'activité transactivatrice (domaine 2)
- maintien de l'antigénicité de la protéine (4 ou 5 mutations maximum, modifiant le moins possible les épitopes CTL)

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage, notamment dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 55.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans l'une au moins des régions suivantes dans le domaine 5 de la protéine Tat de type sauvage :

- le motif RGD,
- la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans le domaine 2 de la protéine Tat de

type sauvage, notamment le remplacement de l'une quelconque des cystéines, avantageusement par une sérine.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte l'une au moins des mutations suivantes :

- 5 – remplacement en position 27 d'une cystéine par une sérine,
- remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine,
- remplacement en position 52 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 55 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 57 d'une arginine par une leucine,
- 10 – remplacement en position 79 d'une glycine par une alanine,
- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,
- remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont
15 le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

- | | | |
|----|-----------|------------------|
| | K51T-R52L | (SEQ ID NO : 2) |
| 20 | K51T-R55L | (SEQ ID NO : 3) |
| | K51T-R57L | (SEQ ID NO : 4) |
| | K51T-G79A | (SEQ ID NO : 5) |
| | K51T-K89L | (SEQ ID NO : 6) |
| | K51T-E92Q | (SEQ ID NO : 7) |
| 25 | R52L-R55L | (SEQ ID NO : 8) |
| | R52L-R57L | (SEQ ID NO : 9) |
| | R52L-G79A | (SEQ ID NO : 10) |
| | R52L-K89L | (SEQ ID NO : 11) |
| | R52L-E92Q | (SEQ ID NO : 12) |
| 30 | R55L-R57L | (SEQ ID NO : 13) |
| | R55L-G79A | (SEQ ID NO : 14) |
| | R55L-K89L | (SEQ ID NO : 15) |

R55L-E92Q (SEQ ID NO : 16)
R57L-G79A (SEQ ID NO : 17)
R57L-K89L (SEQ ID NO : 18)
R57L-E92Q (SEQ ID NO : 19)
5 G79A-K89L (SEQ ID NO : 20)
G79A-E92Q (SEQ ID NO : 21)
K89L-E92Q (SEQ ID NO : 22)

Un mutant avantageux selon la présente invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

10 K51T-R55L (SEQ ID NO : 3)
R52L-R55L (SEQ ID NO : 8)
R52L-G79A (SEQ ID NO : 10)
R55L-R57L (SEQ ID NO : 13)
G79A-K89L (SEQ ID NO : 20)

15 L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

20 C27S-K51T-R52L (SEQ ID NO : 23)
C27S-K51T-R55L (SEQ ID NO : 24)
C27S-K51T-R57L (SEQ ID NO : 25)
C27S-K51T-G79A (SEQ ID NO : 26)
25 C27S-K51T-K89L (SEQ ID NO : 27)
C27S-K51T-E92Q (SEQ ID NO : 28)
C27S-R52L-R55L (SEQ ID NO : 29)
C27S-R52L-R57L (SEQ ID NO : 30)
C27S-R52L-G79A (SEQ ID NO : 31)
30 C27S-R52L-K89L (SEQ ID NO : 32)
C27S-R52L-E92Q (SEQ ID NO : 33)
C27S-R55L-R57L (SEQ ID NO : 34)

| | |
|----------------|------------------|
| C27S-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 35) |
| C27S-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 36) |
| C27S-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 37) |
| C27S-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 38) |
| C27S-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 39) |
| C27S-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 40) |
| C27S-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 41) |
| C27S-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 42) |
| C27S-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 43) |

5

10

La présente invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

| | |
|----------------|------------------|
| C27S-K51T-R55L | (SEQ ID NO : 24) |
| C27S-R52L-R55L | (SEQ ID NO : 29) |
| C27S-R52L-G79A | (SEQ ID NO : 31) |

15

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

20

| | |
|---------------------|------------------|
| C27S-K51T-R52L-G79A | (SEQ ID NO : 44) |
| C27S-K51T-R52L-K89L | (SEQ ID NO : 45) |
| C27S-K51T-R52L-E92Q | (SEQ ID NO : 46) |
| C27S-K51T-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 47) |
| C27S-K51T-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 48) |
| C27S-K51T-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 49) |
| C27S-K51T-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 50) |
| C27S-K51T-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 51) |
| C27S-K51T-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 52) |
| C27S-K51T-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 53) |
| C27S-K51T-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 54) |
| C27S-K51T-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 55) |

25

30

| | | |
|----|---------------------|------------------|
| | C27S-R52L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 56) |
| | C27S-R52L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 57) |
| | C27S-R52L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 58) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 59) |
| 5 | C27S-R52L-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 60) |
| | C27S-R52L-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 61) |
| | C27S-R52L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 62) |
| | C27S-R52L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 63) |
| | C27S-R52L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 64) |
| 10 | C27S-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 65) |
| | C27S-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 66) |
| | C27S-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 67) |
| | C27S-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 68) |
| | C27S-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 69) |
| 15 | C27S-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 70) |
| | C27S-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 71) |
| | C27S-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 72) |
| | C27S-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 73) |
| | C27S-G79A-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 74) |

20 Un mutant avantageux selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

| | | |
|----|---------------------|------------------|
| | C27S-K51T-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 47) |
| | C27S-K51T-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 48) |
| | C27S-K51T-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 49) |
| 25 | C27S-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 59) |

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 75)

| | | |
|----|--------------------------|-------------------|
| | C27S-K51T-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 76) |
| | C27S-K51T-R52L-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 77) |
| | C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 78) |
| | C27S-K51T-R52L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 79) |
| 5 | C27S-K51T-R52L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 80) |
| | C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 81) |
| | C27S-K51T-R52L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 82) |
| | C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 83) |
| | C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 84) |
| 10 | C27S-K51T-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 85) |
| | C27S-K51T-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 86) |
| | C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 87) |
| | C27S-K51T-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 88) |
| | C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 89) |
| 15 | C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 90) |
| | C27S-K51T-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 91) |
| | C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 92) |
| | C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 93) |
| | C27S-R52L-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 94) |
| 20 | C27S-R52L-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 95) |
| | C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 96) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 97) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 98) |
| | C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 99) |
| 25 | C27S-R52L-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 100) |
| | C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 101) |
| | C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 102) |
| | C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 103) |
| | C27S-R55L-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 104) |
| 30 | C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 105) |
| | C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 106) |
| | C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 107) |

C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 108)

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)

5 C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants tels que définis ci-dessus.

La présente invention concerne également les lignées cellulaires transfectées avec une séquence nucléotidique de l'invention.

10 L'invention concerne également des anticorps dirigés contre l'un des mutants tels que définis ci-dessus, et ne reconnaissant pas le domaine D1 de la protéine sauvage.

De tels anticorps sont sélectionnés en testant et en éliminant ceux qui possèdent une affinité pour un peptide correspondant au domaine D1 de Tat , contenant au moins la séquence EPVDPKLEPWKHPGS(résidus 2-16), par exemple dans un test au format
15 Elisa.

Les anticorps selon l'invention reconnaissent ou non la protéine sauvage.

Une classe avantageuse d'anticorps selon l'invention comprend les anticorps tels que définis ci-dessus, reconnaissant la protéine sauvage.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

20 Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un mutant selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène.
25 spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un mutant selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un mutant selon
30 l'invention, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit mutant. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des

hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du mutant de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active l'un au moins des mutants tels que définis ci-dessus ou l'une au moins des séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus, placé sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive de l'un des mutants tels que définis ci-dessus ou l'un au moins des anticorps tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement approprié.

Bien entendu, l'homme du métier déterminera facilement la quantité de mutant à utiliser en fonction des constituants de la composition pharmaceutique.

La présente invention concerne également une composition diagnostique pour la détection et/ou la quantification du virus VIH-1 comprenant au moins un mutant tel que défini ci-dessus, ou au moins un anticorps tel que défini ci-dessus.

Bien entendu, l'homme du métier déterminera facilement la quantité de mutant à utiliser en fonction de la technique diagnostique utilisée.

L'invention concerne également un procédé de détection et/ou de quantification du virus VIH-1 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par le VIH-1, tel que plasma, sérum ou tissu, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon biologique avec une composition diagnostique comprenant un mutant tel que défini ci-dessus ou un anticorps tel que défini ci-dessus, dans des conditions prédéterminées qui permettent, s'il y a lieu, la formation de complexes anticorps/antigène(s) entre le mutant susdéfini et des anticorps dirigés contre la protéine Tat de type sauvage ou entre les anticorps susdéfinis et la protéine Tat de type sauvage, et

- détecter et/ou quantifier la formation desdits complexes par tout moyen

approprié.

Les procédés de détection et/ou de quantification du virus sont mis en œuvre à l'aide de techniques classiques bien connues de l'homme du métier et on peut citer, à titre d'illustration, les blots, les techniques dites sandwich et les techniques de compétitions.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un mutant tel que défini ci-dessus ou d'au moins un anticorps tel que défini ci-dessus pour le diagnostic *in vitro* du virus VIH-1 dans un échantillon ou prélèvement biologique.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un mutant tel que défini ci-dessus ou d'au moins un anticorps tel que défini ci-dessus pour la préparation d'une composition vaccinale.

Les Inventeurs ont ainsi montré que pour les utilisations précitées, il était nécessaire d'effectuer au moins une mutation au niveau du domaine 4 et/ou au moins une mutation au niveau du domaine 5 de la protéine Tat. Ils ont obtenus par mutagenèse dirigée des mutants de la protéine Tat qui ont ensuite été sélectionnés en fonction de leurs propriétés. Les mutants retenus sont choisis parmi les mutants présentant au moins une des mutations suivantes : K51T (remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine au niveau du domaine 4), R52L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 52 dans le domaine 4), R55L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 55 dans le domaine 4), R57L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 57 dans le domaine 4), G79A (remplacement d'une glycine par une alanine en position 79 dans le domaine 5), K89L (remplacement d'une lysine par une leucine en position 89 dans le domaine 5) et E92Q (remplacement d'un acide glutamique par une glutamine en position 92 dans le domaine 5). Tous les positionnements en acides aminés décrits ci dessus et par la suite sont donnés en référence à la séquence complète de 101 acides aminés de la souche ACH320.2A.2.1. L'invention a pour objet les mutants précités. Mais l'invention concerne également des mutants présentant deux mutations au niveau du domaine 4 de la protéine Tat. Ces mutants "doubles" sont sélectionnés parmi les mutants K51T-R55L, R52L-R55L, R52L-G79A, R55L-R57L et G79A-K89L. Les inventeurs ont ensuite montré qu'en associant ces doubles mutations dans le domaine 4 à une mutation supplémentaire C27S dans le domaine 2 (remplacement d'une cystéine par une sérine), ils obtenaient des résultats très satisfaisants. Ainsi, l'invention englobe

également un mutant choisi parmi les "triple" mutants C27S-K51T-R55L, C27S-R52L-R55L et C27S-R52L-G79A. De préférence, le mutant choisi est le mutant C27S-K51T-R55L. Enfin, ils ont prouvé qu'un "quadruple" mutant associant au moins une mutation dans le domaine 2, deux mutations dans le domaine 4 et au moins une mutation dans le domaine 5 présentait d'excellentes performances pour l'obtention d'une protéine Tat non toxique. Le "quadruple" mutant est choisi parmi les mutants C27S-K51T-R55L-G79A, C27S-K51T-R55L-K89L, C27S-K51T-R55L-E92Q et C27S-R52L-R55L-G79A. De préférence, le mutant choisi est le mutant C27S-K51T-R55L-G79A.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente une représentation schématique de la technique de mutagenèse ponctuelle dirigée par PCR.

La Figure 2 représente l'alignement de la séquence protéique de la protéine Tat de la souche ACH320.2A.2.1 (SEQ ID NO : 1) et des séquences protéiques des protéines Tat mutées de l'invention.

Les Figures 3a et 3b correspondent à un diagramme représentant la capacité transactivatrice de ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les résultats représentés pour chaque construction correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. Dans la figure 3a, la colonne NT (non transfecté) représente l'activité basale de la construction LTR-CAT.

L'axe des ordonnées représente le facteur multiplicatif de transactivation.

Les Figures 4a et 4b représentent la localisation intracellulaire de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants.

La Figure 5 représente la capacité de transduction de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. La ligne de coupure a été déterminée en calculant la moyenne + 3 SD (déviations standard) du pourcentage de transactivation mesuré pour pEGFP.

Les colonnes blanches correspondent à une co-culture 293T/HL3T1 et les colonnes noires à la transfection des cellules HL3T1.

L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de transactivation par rapport à ACH320.2A.2.1 sauvage.

5

La Figure 6 représente une méthode supplémentaire de criblage des lignées cellulaires exprimant les mutants de l'invention (décrites dans l'exemple 5).

10

Le Tableau 1 représente les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR de Tat.

EXEMPLE 1 : Construction de l'ADN muté codant pour la protéine Tat mutée.

15

Un fragment de l'ADNc de 306 paires de bases correspondant au deux exons du gène Tat du type sauvage de l'isolat ACH320.2A.2.1 de VIH-1 (11,12) est muté en utilisant un kit PCR commercial (Clontech) et les amorces nucléotidiques décrites dans le tableau 1. Le principe de la mutagenèse dirigée ponctuelle par PCR est décrit à la figure 1.

20

Comme montré sur la figure 1, à partir de l'ADNc du gène *tat* sauvage, on effectue deux PCR de façon indépendante avec une amorce située à l'extrémité (E5' ou E3') et une amorce interne située dans le gène et portant la mutation souhaitée (M3' et M5', respectivement) (premier cycle de la PCR). On mélange alors les deux produits de PCR de façon équimolaire et on effectue un deuxième cycle de PCR avec des amorces d'extrémité contenant les sites de restriction EcoRI en 5' et SalI en 3'. On obtient ainsi les ADNc mutés à l'endroit désiré.

25

30

Ce principe a été utilisé pour tous les mutants sauf pour les mutations K89L et E92Q. Pour ces dernières les nucléotides devant être mutés étaient localisés à proximité d'une des extrémités de l'ADNc, permettant une mutagenèse dirigée par PCR semi nichée directe en utilisant pour le premier cycle de PCR respectivement les paires d'amorces suivantes : E5'/K89L (M3') et E5'/E92Q (M5').

Le double mutant R52L-R55L, a été généré en utilisant les amorces pour mutagenèse simple suivantes contenant les deux mutations :

R52L-R55L (M5')

5'-GGCAGGAAGCTTAGACAGCTGCGAAGATC-3'

R52L-R55L (M3')

5'-GATCTTCGCAGCTGTCTAAGCTTCTTCCTGCC-3'

Le double mutant R52L-G79A a été obtenu en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant G79A et comme paire d'amorces la paire R52L (M5') / R52L (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le double mutant G79A-K89L a été généré par PCR semi nichée en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant G79A et la paire d'amorces E5' / K89L (M3') pour le premier cycle de PCR.

Le triple mutant C27S-K51T-R55L (STL) a été obtenu en utilisant l'ADNc du double mutant K51T-R55L comme matrice et une paire d'amorces C27S (M5') / C27S (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le triple mutant C27S-R52L-G79A a été obtenu en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant R52L-G79A et comme paire d'amorces la paire C27S (M5') / C27S (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le quadruple mutant C27S-K51T-R55L-G79A (STLA) a été généré en utilisant l'ADNc de STL comme matrice et les amorces G79A (M5') / G79A (M3') pour la mutagenèse.

Tous les premiers cycles de PCR ont été réalisés en utilisant 0,5µg de plasmide, 0,2ng/ml de chacune des amorces dans les conditions suivantes : 1x94°C 5' 1x[94°C 2' 50°C 2' 72°C 4'] 25x[94°C 1' 50°C 1' 72°C 4'] 1x72°C 5'.

La paire d'amorce EcoRI / SalI a été utilisée pour le second cycle de toutes les mutagenèses dirigées par PCR, excepté pour les mutants R52L, R55L et le double mutant R52L-R55L, pour lesquels l'amorce SalI 3' a été remplacée par l'amorce E6854. Dans tous les cas le second cycle a été réalisé en utilisant les mêmes conditions que pour le premier cycle et 0,5µl des produits de PCR 5' et 3' des premiers cycles (figure 1). Une bande de 323 paires de bases a été créée et a ensuite été liée dans le plasmide pCR2.1-Topo (Invitrogen, K4500-40) selon le protocole du fabricant pour créer les constructions pCR-TEX.

Les clones positifs ont été ensuite sélectionnés après séquençage automatisé en utilisant le DyeTerminator sequencing mix (nom commercial) sur le séquenceur automatique 377X (Applied Biosystems). L'analyse des séquences a été faite en

utilisant le logiciel MacVector 7.0 (Oxford Molecular). Parmi toutes les constructions séquencées, toutes contenaient uniquement la mutation désirée, sauf l'un des clones dérivé du produit PCR-R55L, qui montrait une mutation supplémentaire K->T à la position 51. Ce double mutant K51T-R55L a été donc conservé pour une analyse supplémentaire, et le mutant simple K51T a été généré en utilisant les amorces K51T (M5') et K51T (M3').

Les fragments EcoRI-SalI ou EcoRI-EcoRI des constructions pCR-TEX ont été sous clonés dans un vecteur eucaryote pEGFP-C2 (Clontech) dans lequel le mutant Tat est fusionné en position C-terminale avec EGFP (Enhanced Fluorescent Green Protein). Il a été montré auparavant que la fusion de l'EGFP à Tat n'altère pas la capacité transactivatrice de Tat, ni sa localisation cellulaire (25). Les étapes de clonage ont été réalisées dans *Escherichia coli* (*E. Coli*) DH5 α selon les techniques standards de biologie moléculaire (23). Les constructions pEGFP-TEX, dans lesquelles l'expression de la protéine de fusion est sous le contrôle du promoteur du Cytomegalovirus (CMV) ont été obtenues et criblées par séquençage automatique pour les clones positifs. Les séquences en acides aminés des clones positifs qui ont été sélectionnés sont représentées à la figure 2. L'ADN de ces clones a été amplifié, purifié en utilisant le kit Nucléobond AX (nom commercial) (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

EXEMPLE 2 : Capacité de trans-activation des mutants Tat.

Pour étudier la capacité trans-activatrice des protéines de fusion EGFP-Tat, la lignée cellulaire HL3T1 a été utilisée. Cette lignée est un dérivé de cellules HeLa, transfecté de manière stable avec un gène de la Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) sous la dépendance du promoteur viral de VIH-1 (LTR) (8). Un jour après ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cellules HL3T1 dans des plaques de 6 puits, les cellules ont été transfectées avec 2 μ g des constructions pEGFP-TEX en utilisant le kit Exgen 500 (commercialisé par Euromedex) selon le protocole préconisé par le fabricant. Après 48 heures à 72 heures de culture, les cellules ont été trypsinisées et la quantité de cellules transfectées a été estimée par microscopie de fluorescence. L'équivalent de $1,5 \times 10^3$ cellules fluorescentes a été lysé dans 100 μ l de Tris 0,01M-EDTA 1mM-NaCl 150mM (TEN) et soumis à une étape de congélation/décongélation avant traitement pendant 20 minutes à 65°C. La mesure de l'activité CAT a été ensuite réalisée dans un essai

d'extraction de phases, comme précédemment décrit (24). Brièvement, 70µl de lysats cellulaires ont été incubés pendant 2 heures à 37°C avec 130µl du mélange réactionnel CAT (Tris-HCl pH=7,5 150mM, EDTA 0,2nM, NaCl 30mM, Butyryl Coenzyme A 0,3mg/ml, glycerol 3%, *D-threo*-[dichloroacetyl-1-¹⁴C]chloramphenicol 0,08µCi). Le mélange réactionnel a ensuite été extrait en utilisant 400µl d'un mélange de pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) et de xylène à un rapport volume/volume de 2 : 1. La radioactivité a été mesurée sur 300µl de la phase organique résultante en utilisant un compteur à scintillation.

Les figures 3a et 3b montrent qu'aucune des mutations simples ne permet à elle seule de détruire complètement l'activité trans-activatrice de la protéine Tat de ACH320.2A.2.1, sauf pour le mutant C27S. Le mutant R55L ne modifie pas de manière très significative l'activité trans-activatrice de Tat de ACH320.2A.2.1. Mais cette mutation combinée avec l'une des mutations K51T ou R52L montre une inhibition très significative de l'activité trans-activatrice de Tat. Cette inhibition est totale pour les triple et quadruple mutants STL et STLA.

EXEMPLE 3 : Localisation intracellulaire des protéines de fusion Tat-EGFP.

Le domaine basique de Tat est responsable de la localisation nucléaire de Tat. Certaines des mutations qui ont été construites affectent ce domaine basique. Aussi, les inventeurs ont voulu identifier les mutations qui affectaient la localisation intracellulaire de Tat. Après ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cellules HL3T1 sur des lamelles de microscopie, les cellules ont été transfectées avec 2µg de chaque construction pEGFP-TEX en utilisant le kit Exgen 500 (commercialisé par Eurimedex) selon le protocole préconisé par le fabricant. Après 1, 2 ou 3 jours les lamelles sont récupérées et fixées avec du paraformaldéhyde 4% avant observation sur microscope à fluorescence Axioplan 2 (nom commercial) (Zeiss). Comme montré à la figure 4a ou b (A et B) et comme cela a déjà été décrit (25), la protéine de fusion Tat-EGFP de type sauvage montrait une localisation nucléaire au bout de 3 jours de culture. Les simples mutations de Tat n'affectaient pas cette localisation (figure 4a, C à H), ni la double mutation R52L-R55L (figure 4a, I), R52L-G79A (figure 4b, C), G79A-K89L (figure 4b, D), ni le triple mutant C27S-R52L-G79A (figure 4b, E). Cependant, la combinaison K51T-R55L ou des mutants multiples la contenant (STL, STLA) montraient à la fois une localisation

nucléaire et cytoplasmique de la protéine Tat-EGFP au 3^{ème} jour (figure 4a, J à L), alors que le signal était strictement nucléaire au 1^{er} et 2^{ème} jour suivant la transfection. Il semble donc que le signal de la localisation nucléaire de Tat est discontinu et contient au moins les résidus K51 et R55, mais pas R52.

EXEMPLE 4 : Activité transcellulaire des mutants Tat.

Différentes études ont montré que le nombre total de résidus basiques dans le domaine basique de Tat joue un rôle dans la capacité de la protéine Tat, sécrétée par des cellules infectées et présente dans le milieu extracellulaire, à être internalisée par des cellules non infectées, phénomène également appelé transduction. Les inventeurs ont évalué la capacité de transduction des constructions contenant des mutations dans ce domaine basique. Un essai de co-culture a été effectué entre des cellules productrices et des cellules effectrices. Les cellules 293T ont été transfectées avec 3µg des constructions pEGFP-TEX en utilisant la technique au phosphate de calcium (23). 24 heures après la transfection, les cellules 293T transfectées ont été trypsiniées et co-cultivées avec 2,5x10⁵ cellules HL3T1 pendant 48 heures supplémentaires en présence de 100µM chloroquine. Les cellules ont ensuite été récoltées et lysées dans du TEN avant évaluation de l'activité CAT, comme décrit précédemment. Parce que ce système dépend à la fois de l'efficacité de la transduction et de l'activité trans-activatrice, les inventeurs sont partis du postulat qu'un changement drastique dans la capacité de transduction se traduirait par une différence significative entre l'activité mesurée après transfection directe et l'activité mesurée après co-culture, par rapport à un contrôle positif standardisé. C'est la raison pour laquelle toutes les données sont représentées en pourcentage de l'activité trans-activatrice de la protéine de type sauvage de l'isolat ACH320.2A.2.1 et que les données obtenues à partir de la transfection des cellules HL3T1 et la co-culture des cellules 293T/HL3T1 sont comparées pour chaque construction. Comme montré à la figure 5, la mutation R55L n'altère pas de manière significative la capacité de transduction de la protéine. La mutation R52L diminue de manière significative la capacité de transduction de la protéine (diminution de 5 fois de l'activité CAT entre les cellules HL3T1 transfectées avec cette construction et les cellules HL3T1 co-cultivées avec les cellules 293T exprimant pEGFP-TEX-R52L). Le double mutant R52L-R55L montre une perte complète de sa capacité de transduction,

comme montré par le bruit de fond de l'activité CAT mesurée après co-culture. Les résultats obtenus à la fois avec les mutants R52L et R52L-R55L plaident en faveur du fait que la capacité de transduction de Tat est corrélée avec le nombre de résidus arginine dans le domaine basique (27). Il semblerait que le résidu R55 est moins important pour la capacité de transduction de Tat que le résidu R52. Donc, la localisation des résidus arginine pourrait aussi jouer un rôle dans le mécanisme complet de la transduction.

EXEMPLE 5 : Clonage de lignées cellulaires transfectées avec les séquences nucléotidiques de l'invention.

De nombreux tests fonctionnels de la régulation de gènes cellulaires par la protéine Tat du VIH-1 impliquent l'utilisation de lignées cellulaires exprimant de façon constitutive cette protéine. Les Inventeurs ont donc établi des lignées cellulaires exprimant les différents mutants de la protéine Tat. Pour ce faire, des cellules HeLa ont étéensemencées à $2,5 \times 10^5$ cellules par puits d'une plaque 6 puits puis transfectées le lendemain avec 2 μ g d'ADN codant pour les divers mutants de Tat en utilisant le réactif Exgen 500 (commercialisé par Euromedex). Afin d'effectuer un clonage biologique de ces lignées transfectées, les cellules ont été trypsinées et comptées 3 jours après transfection, puisensemencées à une concentration de 3 à 30 cellules par puits dans des plaques 96 puits à fond plat, à raison de 3 à 5 plaques 96 puits par transfection (pour un total de 288 à 480 puits par transfection). La culture en plaque 96 puits a alors été effectuée pendant 15 jours en présence de 500 μ g/ml de généticine (Généticine Sulfate, Gibco-BRL). Après 15 jours, les puits dans lesquels les cellules étaient encore vivantes et s'étaient multipliées de façon notable étaient considérés comme positifs. De façon standard, un clonage biologique a été considéré comme réussi lorsque chaque plaque 96 puits issue de la même transfection contenait moins de 10 puits positifs par plaque. De 3 à 15 puits positifs par transfection ont alors été amplifiés en présence de généticine pendant 6 passages pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour congélation. Au sixième passage, l'expression de la protéine Tat a été vérifiée par immunotransfert (western blot) pour chaque clone.

Après vérification de l'expression de Tat par immunotransfert dans les lignées cellulaires ainsi générées, les Inventeurs ont utilisé une construction plasmidique

contenant le gène CAT sous la dépendance du promoteur viral du VIH (construction LTR-CAT) pour transfecter les différents clones de lignées cellulaires ainsi obtenus. Il a ainsi pu être montré que l'expression stable des mutants de Tat dans cette lignée cellulaire ne modifiait pas leur activité transactivatrice (figure 6).

5

EXEMPLE 6 : Mutant en position 58

10

Le simple mutant S58A est obtenu en utilisant comme matrice l'ADNc du gène Tat sauvage de la souche ACH.320.2A.2.1 et comme paire d'amorce la paire S58A (M5') / S58A (M3'). Cependant, il existe d'autres souches du VIH-1 qui portent naturellement une alanine en position 58 et qui possèdent toutes les propriétés d'une Tat fonctionnelle (localisation nucléaire, transactivation...) comme par exemple la souche HXB2. Une telle mutation S58A sur la souche ACH320.2A.2.1 ne modifie pas le comportement de la protéine et ne permet pas d'atteindre la détoxification de Tat .

| Amorces d'extrémité, 1 ^{er} cycle | Séquence |
|---|--|
| E5' | 5'- GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT C- 3' |
| E3' | 5'- AGA TCT CTA ATC GAC CGG ATC- 3' |
| Amorces d'extrémité, 2 ^{ème} cycle | |
| EcoR I | 5'- AAA GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT CC- 3' |
| E6854 | 5'- AAA GAT CTC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3' |
| Sal I | 5'- AAG TCG ACC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3' |
| Amorces internes | |
| W11F (M5') | 5'- CCA GTA GAT CCT AAA CTA GAG CCC TTC AAG CAT CCA G- 3' |
| C27S (M5') | 5'- ACA ATT GCT ATT CGA AAA AGT G- 3' |
| C27S (M3') | 5'- CAC TTT TTC GAA TAG CAA TTG T- 3' |
| K50R (M5') | 5'- ATC TCA TAT GGC AGG CGG AAG -3' |
| K50R (M3') | 5'- CTT CCG CCT GCC ATA TGA GAT -3' |
| K51T (M5') | 5'- GGC AGG AAG ACC CGG AGA CAG C- 3' |
| K51T (M3') | 5'- GCT GTC TCC GGG TCT TCC TGC C- 3' |
| R52L (M5') | 5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CGA CGA AGA TC -3' |
| R52L (M3') | 5'- GAT CTT CGT CGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC- 3' |
| R55L (M5') | 5'- GGC AGG AAG AAG CGG AGA CAG CTG CGA AGA TC- 3' |
| R55L (M3') | 5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTC CGC TTC TTC CTG CC- 3' |
| R57L (M5') | 5'- GAC AGC GAC GAC TAT CTC CTC AAG AC -3' |
| R57L (M3') | 5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG TCG CTG TC- 3' |
| G79A (M5') | 5'- CAG CCC CGA GCG GAT CCG ACA GG- 3' |
| G79A (M3') | 5'- CCT GTC GGA TCC GCT CGG GGC TG- 3' |
| K89L (M3') | 5'- CTG TCT CTG TCT CTC TCT CCA CCT TAA GCT TCG ATT CC- 3' |
| E92Q (M3') | 5'- CTG TCT CTG TCT CTC TTT GCA CCT TCT TCT TCG AAT CC- 3' |
| R52L-R55L (M5') | 5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CTG CGA AGA TC - 3' |
| R52L-R55L (M3') | 5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC - 3' |
| R55L-R57L (M5') | 5'- GAA GCG GAG ACA GCT GCG ACT ATC TCC TCA AGA C -3' |
| R55L-R57L (M3') | 5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG CAG CTG TCT CCG CTT C -3' |
| S58A (M5') | 5'- GAC AGC GAC GAA GAG CAC CTC AAG ACA GT -3' |
| S58A (M3') | 5'- ACT GTC TTG AGG TGC TCT TCG TCG CTG TC -3' |

TABLEAU 1

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albini, A., G. Barillari, R. Benelli, R. C. Gallo, and B. Ensoli. 1995. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. Proc Natl Acad Sci USA. 92:4838-4842.
2. Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraudo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, and F. Bussolino. 1996. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk- 1/KDR receptor on vascular endothelial cells. Nat Med. 2:1371-5.
3. Bartz, S. R., and M. Emerman. 1999. Human Immunodeficiency Virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/Caspase-8. J Virol. 73:1956-1963.
4. Cafaro, A., A. Caputo, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, D. Goletti, S. Baroncelli, M. Pace, L. Sernicola, M. L. Koanga-Mogtomo, M. Beti, A. Borsetti, R. Belli, L. Akerblom, F. Corrias, S. Butto, J. Heeney, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 1999. Control of SVIH-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. Nat Med. 5:643-650.
5. Cafaro, A., A. Caputo, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, C. Fracasso, M. Pace, A. Borsetti, L. Sernicola, D. R. Negri, P. Ten Haaf, M. Betti, Z. Michelini, I. Macchia, E. Fanales-Belasio, R. Belli, F. Corrias, S. Butto, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 2000. SHIV89.6P pathogenicity in cynomolgus monkeys and control of viral replication and disease onset by human immunodeficiency virus type 1 Tat vaccine. J Med Primatol. 29:193-208.
6. Cafaro, A., F. Titti, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, A. Caputo, D. Goletti, A. Borsetti, M. Pace, E. Fanales-Belasio, B. Ridolfi, D. R. Negri, L. Sernicola, R. Belli, F. Corrias, I. Macchia, P. Leone, Z. Michelini, P. ten Haaf, S. Butto, P. Verani, and B. Ensoli. 2001. Vaccination with DNA containing tat coding

sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine*. **19**:2862-77.

5 7. **Cullen, B. R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev*. **56**:375-394.

8. **Felber, B. K., and G. N. Pavlakis.** 1988. A quantitative bioassay for HIV-1 based on trans-activation. *Science*. **239**:184-187.

10 9. **Frankel, A. D., and C. O. Pabo.** 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. **55**:1189-1193.

15 10. **Gringeri, A., E. Santagostino, M. Muca-Perja, H. Le Buanec, B. Bizzini, A. Lachgar, J. F. Zagury, J. Rappaport, A. Burny, R. C. Gallo, and D. Zagury.** 1999. Tat toxoid as a component of a preventive vaccine in seronegative subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol*. **20**:371-375.

20 11. **Groenink, M., A. C. Andeweg, R. A. Fouchier, S. Broersen, R. C. van der Jagt, H. Schuitemaker, R. E. de Goede, M. L. Bosch, H. G. Huisman, and M. Tersmette.** 1992. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol*. **66**:6175-6180.

25 12. **Guillon, C., F. Bedin, R. A. M. Fouchier, H. Schuitemaker, and R. A. Gruters.** 1995. Completion of nucleotide sequences of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV type 1 variants isolated from the same patient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **11**:1537-1538.

30 13. **Hauber, J., M. H. Malim, and B. R. Cullen.** 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol*. **63**:1181-1187.

14. **Helland, D. E., J. L. Welles, A. Caputo, and W. A. Haseltine.** 1991. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol.* **65**:4547-4549.

5 15. **Higuchi, R.** 1990. Recombinant PCR, p. 177-183. *In* M. A. Innis, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA.

10 16. **Howcroft, T. K., K. Strebel, M. A. Martin, and D. S. Sinder.** 1993. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science.* **260**:1320-1322.

15 17. **Jeang, K.-T.** 1996. VIH-1 Tat: structure and function, p. 3-18. *In* G. Myers and B. Foley and J. W. Mellors and B. Korber and K. T. Jeang and S. Wain-Hobson (ed.), Human retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los alamos National Laboratory, Los Alamos.

 18. **Jeang, K. T., H. Xiao, and E. A. Rich.** 1999. Multifaceted activities of the VIH-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem.* **274**:28837-28840.

20 19. **Meyaard, L., S. A. Otto, H. Schuitemaker, and F. Miedema.** 1992. Effects of VIH-1 Tat protein on human T-cell proliferation. *Eur J Immunol.* **22**:2729-2732.

25 20. **Mitola, S., R. Soldi, I. Zanon, L. Barra, M. I. Gutierrez, B. Berkhout, M. Giacca, and F. Bussolino.** 2000. Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol.* **74**:344-53.

30 21. **Osterhaus, A. D. M. E., C. A. van Baalen, R. A. Gruters, M. Schutten, C. H. Siebelink, E. G. Hulskotte, E. J. Tijhaar, R. E. Randall, G. van Amerongen, A. Fleuchaus, V. Erfle, and G. Sutter.** 1999. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine.* **17**:2713-2714.

22. Ott, M., S. Emiliani, C. Van Lint, G. Herbein, J. Lovett, N. Chirmule, T. McCloskey, S. Pahwa, and E. Verdin. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science*. **275**:1481-1485.

23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

24. Seed, B., and J. Sheen. 1988. A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene*. **67**:271-277.

25. Stauber, R. H., and G. N. Pavlakis. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology*. **252**:126-136.

26. van Baalen, C. A., O. Pontesilli, R. C. Huisman, A. M. Geretti, M. R. Klein, F. de Wolf, F. Miedema, R. A. Gruters, and A. D. M. E. Osterhaus. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol*. **78**:1913-1918.

27. Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, and J. B. Rothbard. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:13003-13008.

28. Westendorp, M. O., R. Frank, C. Oschenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. **375**:497-500.

29. Westendorp, M. O., M. Li-Weber, R. W. Frank, and P. H. Krammer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in

activated T cells. J. Virol. 68:4177-4185.

30. Zauli, G., D. Gibellini, D. Milani, M. Mazzoni, P. Borgatti, M. La Placa,
and S. Capitani. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects
5 lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. Cancer Res.
53:4481-4485.

31. Mayhood T, Kaushik N, Pandey PK, Kashanchi F, Deng L, Pandey VN.
2000. Inhibition of Tat-mediated transactivation of HIV-1 LTR transcription by
10 polyamide nucleic acid targeted to TAR hairpin element. Biochemistry, 39, 11532-
11539.

32. Tyagi M., Rusnati M., Presta M., Giacca M. 2001. Internalization of HIV-1
tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem., 276, 3254-3261.

33. Stauber RH, Pavlakis GN. 1998. Intracellular trafficking and interactions of
the HIV-1 Tat protein. Virology, 252, 126-136.

34. Endo S., Kubota S., Siomi H., Adachi A., Oroszlan S., Maki M., Hatanaka
20 M. 1989. A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for
trans-acting activity and nucleolar localization. Virus Genes, 3, 99-110.

REVENDICATIONS

1. Mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage, et en ce que, lorsque la mutation est dans la région du domaine 4, elle est dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57, et en ce que, lorsque la mutation est dans le domaine 5, elle est soit dans le motif RGD, soit dans la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92, les mutations étant des mutations par substitution d'un acide aminé par un autre.

2. Mutant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

3. Mutant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

4. Mutant selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation additionnelle susceptible de conférer une perte de l'activité transactivatrice de la protéine Tat de type sauvage.

5. Mutant selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 55.

6. Mutant selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans le domaine 2 de la protéine Tat de type sauvage, notamment le remplacement de l'une quelconque des cystéines, avantageusement par une sérine.

7. Mutant selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte l'une au moins des mutations suivantes :

- remplacement en position 27 d'une cystéine par une sérine,
- remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine,
- 5 — remplacement en position 52 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 55 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 57 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 79 d'une glycine par une alanine,
- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,
- 10 — remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

8. Mutant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

K51T-R52L (SEQ ID NO : 2)

K51T-R55L (SEQ ID NO : 3)

20 K51T-R57L (SEQ ID NO : 4)

K51T-G79A (SEQ ID NO : 5)

K51T-K89L (SEQ ID NO : 6)

K51T-E92Q (SEQ ID NO : 7)

R52L-R55L (SEQ ID NO : 8)

25 R52L-R57L (SEQ ID NO : 9)

R52L-G79A (SEQ ID NO : 10)

R52L-K89L (SEQ ID NO : 11)

R52L-E92Q (SEQ ID NO : 12)

R55L-R57L (SEQ ID NO : 13)

30 R55L-G79A (SEQ ID NO : 14)

R55L-K89L (SEQ ID NO : 15)

R55L-E92Q (SEQ ID NO : 16)

| | | |
|---|-----------|------------------|
| | R57L-G79A | (SEQ ID NO : 17) |
| | R57L-K89L | (SEQ ID NO : 18) |
| | R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 19) |
| | G79A-K89L | (SEQ ID NO : 20) |
| 5 | G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 21) |
| | K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 22) |

9. Mutant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

| | | |
|----|-----------|------------------|
| 10 | K51T-R55L | (SEQ ID NO : 3) |
| | R52L-R55L | (SEQ ID NO : 8) |
| | R52L-G79A | (SEQ ID NO : 10) |
| | R55L-R57L | (SEQ ID NO : 13) |
| | G79A-K89L | (SEQ ID NO : 20) |

15

10. Mutant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre.:

| | | |
|----|----------------|------------------|
| | C27S-K51T-R52L | (SEQ ID NO : 23) |
| | C27S-K51T-R55L | (SEQ ID NO : 24) |
| | C27S-K51T-R57L | (SEQ ID NO : 25) |
| 25 | C27S-K51T-G79A | (SEQ ID NO : 26) |
| | C27S-K51T-K89L | (SEQ ID NO : 27) |
| | C27S-K51T-E92Q | (SEQ ID NO : 28) |
| | C27S-R52L-R55L | (SEQ ID NO : 29) |
| | C27S-R52L-R57L | (SEQ ID NO : 30) |
| 30 | C27S-R52L-G79A | (SEQ ID NO : 31) |
| | C27S-R52L-K89L | (SEQ ID NO : 32) |
| | C27S-R52L-E92Q | (SEQ ID NO : 33) |

| | | |
|----|----------------|------------------|
| | C27S-R55L-R57L | (SEQ ID NO : 34) |
| | C27S-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 35) |
| | C27S-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 36) |
| | C27S-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 37) |
| 5 | C27S-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 38) |
| | C27S-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 39) |
| | C27S-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 40) |
| | C27S-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 41) |
| | C27S-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 42) |
| 10 | C27S-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 43) |

11. Mutant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

| | | |
|----|----------------|------------------|
| | C27S-K51T-R55L | (SEQ ID NO : 24) |
| 15 | C27S-R52L-R55L | (SEQ ID NO : 29) |
| | C27S-R52L-G79A | (SEQ ID NO : 31) |

12. Mutant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

| | | |
|----|---------------------|------------------|
| | C27S-K51T-R52L-G79A | (SEQ ID NO : 44) |
| 25 | C27S-K51T-R52L-K89L | (SEQ ID NO : 45) |
| | C27S-K51T-R52L-E92Q | (SEQ ID NO : 46) |
| | C27S-K51T-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 47) |
| | C27S-K51T-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 48) |
| | C27S-K51T-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 49) |
| 30 | C27S-K51T-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 50) |
| | C27S-K51T-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 51) |
| | C27S-K51T-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 52) |

| | | |
|----|---------------------|------------------|
| | C27S-K51T-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 53) |
| | C27S-K51T-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 54) |
| | C27S-K51T-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 55) |
| | C27S-R52L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 56) |
| 5 | C27S-R52L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 57) |
| | C27S-R52L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 58) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 59) |
| | C27S-R52L-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 60) |
| | C27S-R52L-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 61) |
| 10 | C27S-R52L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 62) |
| | C27S-R52L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 63) |
| | C27S-R52L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 64) |
| | C27S-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 65) |
| | C27S-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 66) |
| 15 | C27S-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 67) |
| | C27S-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 68) |
| | C27S-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 69) |
| | C27S-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 70) |
| | C27S-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 71) |
| 20 | C27S-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 72) |
| | C27S-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 73) |
| | C27S-G79A-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 74) |

25 13. Mutant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

| | |
|---------------------|------------------|
| C27S-K51T-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 47) |
| C27S-K51T-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 48) |
| C27S-K51T-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 49) |
| C27S-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 59) |

30

14. Mutant selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des

mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

| | | |
|----|--------------------------|-------------------|
| 5 | C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 75) |
| | C27S-K51T-R52L-R55L-G79A | (SEQ ID NO : 76) |
| | C27S-K51T-R52L-R55L-K89L | (SEQ ID NO : 77) |
| | C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q | (SEQ ID NO : 78) |
| | C27S-K51T-R52L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 79) |
| 10 | C27S-K51T-R52L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 80) |
| | C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 81) |
| | C27S-K51T-R52L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 82) |
| | C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 83) |
| | C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 84) |
| 15 | C27S-K51T-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 85) |
| | C27S-K51T-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 86) |
| | C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 87) |
| | C27S-K51T-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 88) |
| | C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 89) |
| 20 | C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 90) |
| | C27S-K51T-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 91) |
| | C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 92) |
| | C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 93) |
| | C27S-R52L-R55L-R57L-G79A | (SEQ ID NO : 94) |
| 25 | C27S-R52L-R55L-R57L-K89L | (SEQ ID NO : 95) |
| | C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q | (SEQ ID NO : 96) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 97) |
| | C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 98) |
| | C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 99) |
| 30 | C27S-R52L-R57L-G79A-K89L | (SEQ ID NO : 100) |
| | C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q | (SEQ ID NO : 101) |
| | C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q | (SEQ ID NO : 102) |

35

C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 103)
C27S-R55L-R57L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 104)
C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 105)
C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 106)
5 C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 107)
C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 108)

15. Mutant selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

10 C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)
C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)

16. Séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants selon l'une des revendications 1 à 15.

15

17. Lignée cellulaire transfectée avec une séquence nucléotidique selon la revendication 16.

18. Anticorps dirigés contre l'un des mutants selon l'une des revendications 1 à 15,
20 ne reconnaissant pas le domaine D1 de la protéine sauvage.

19. Anticorps selon la revendication 18, reconnaissant la protéine sauvage.

20. Anticorps selon la revendication 18, ne reconnaissant pas la protéine sauvage.

25

21. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active l'un au moins des mutants selon l'une des revendications 1 à 15, ou l'une au moins des séquences nucléotidiques selon la revendication 16, placée sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive de l'un des mutants selon
30 l'une des revendications 1 à 15, ou l'un au moins des anticorps selon l'une des revendications 18 à 20, en association avec un véhicule pharmaceutiquement approprié.

22. Composition diagnostique pour la détection et/ou la quantification du virus VIH-1 comprenant au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 1 à 15 ou au moins un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20.

5 23. Procédé de détection et/ou de quantification du virus VIH-1 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par le VIH-1, tel que plasma, sérum ou tissu, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

10 - mettre en contact ledit échantillon biologique avec une composition diagnostique comprenant un mutant tel que défini dans l'une des revendications 1 à 15 ou un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20, dans des conditions prédéterminées qui permettent, s'il y a lieu, la formation de complexes anticorps/antigène(s) entre le mutant susdéfini et des anticorps dirigés contre la protéine Tat de type sauvage ou entre les anticorps susdéfinis et la protéine Tat de type sauvage, et

15 - détecter et/ou quantifier la formation desdits complexes par tout moyen approprié.

24. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 1 à 15 ou au moins un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20, pour le diagnostic in vitro du virus VIH-1 dans un échantillon ou prélèvement biologique.

25. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 1 à 15 ou d'au moins un anticorps selon l'une des revendications 18 à 20, pour la préparation d'une composition vaccinale.

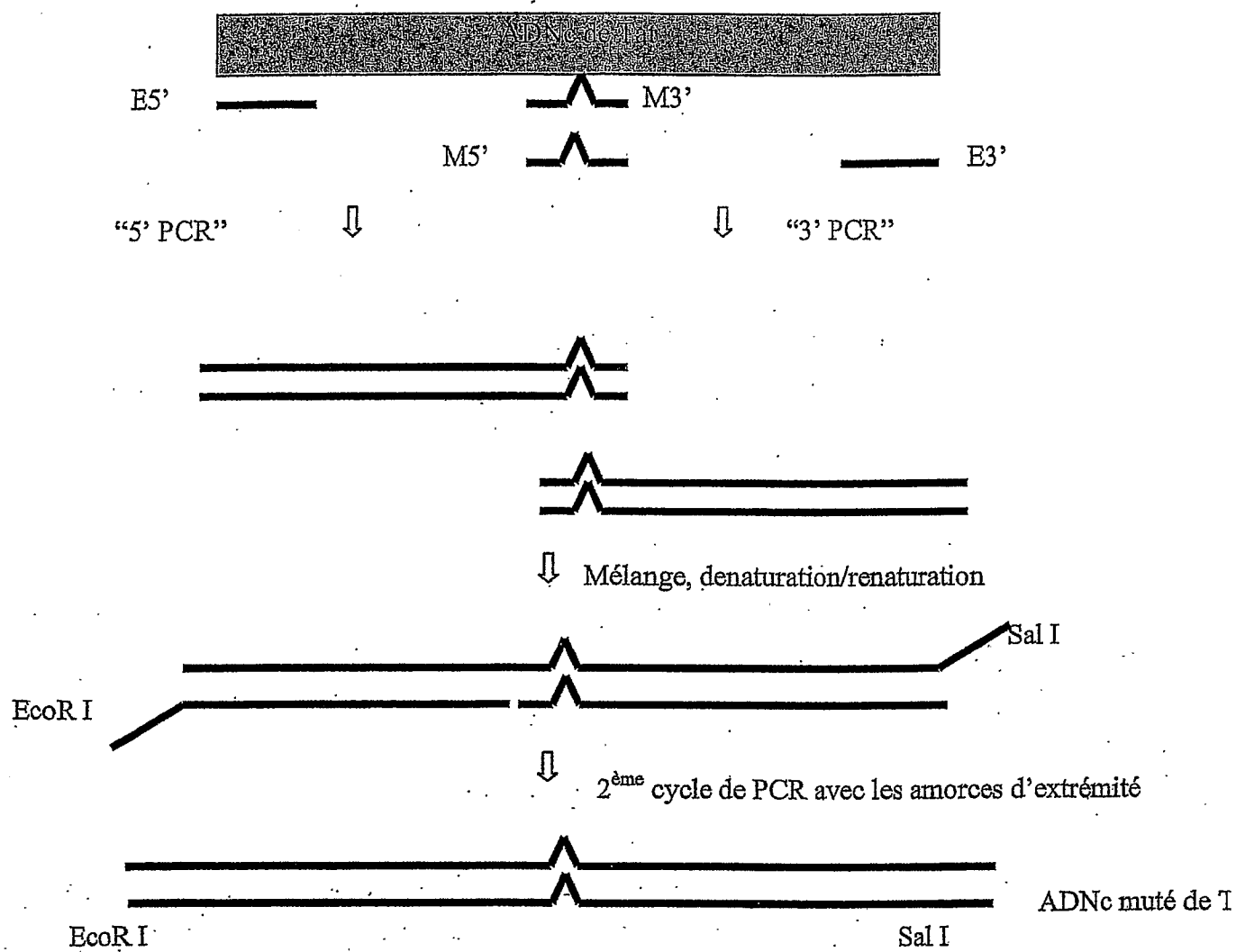
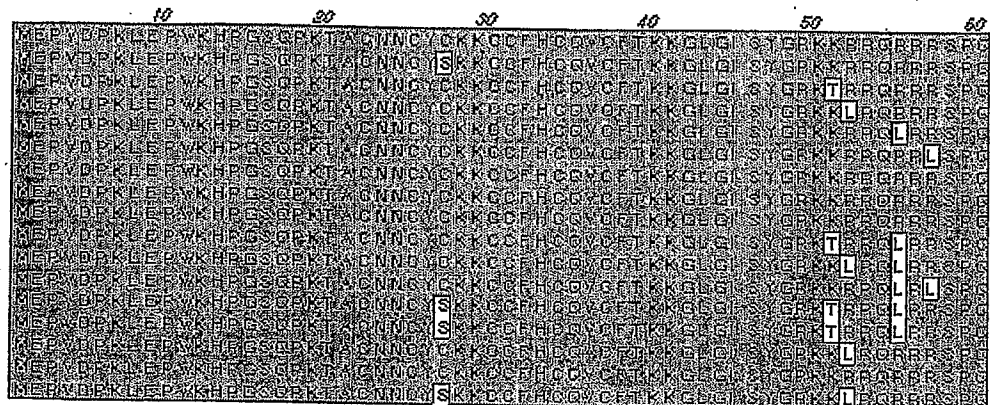


FIGURE 1

ACH320.2A.2.1
C27S
K51T
R52L
R55L
R57L
G79A
K89L
E92Q
K51T-R55L
R52L-R55L
R55L-R57L
STL
STLA
R52L-G79A
G79A-K89L
C27S-R52L-G79A



ACH320.2A.2.1
C27S
K51T
R52L
R55L
R57L
G79A
K89L
E92Q
K51T-R55L
R52L-R55L
R55L-R57L
STL
STLA
R52L-G79A
G79A-K89L
C27S-R52L-G79A

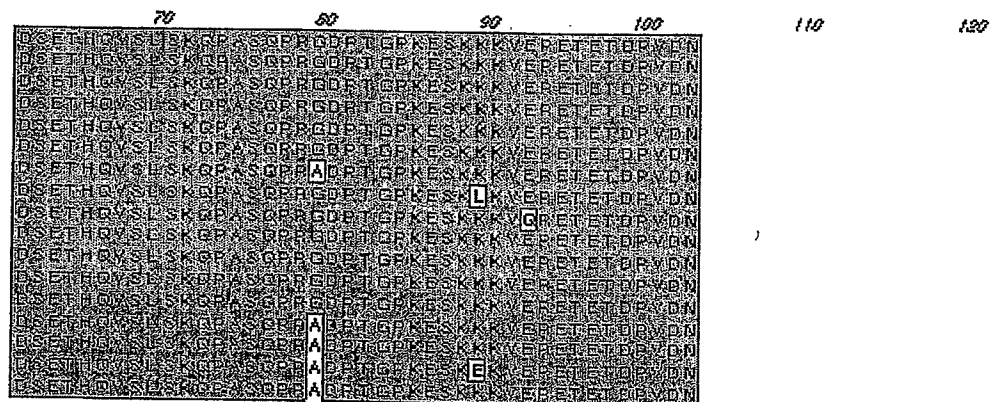


FIGURE 2

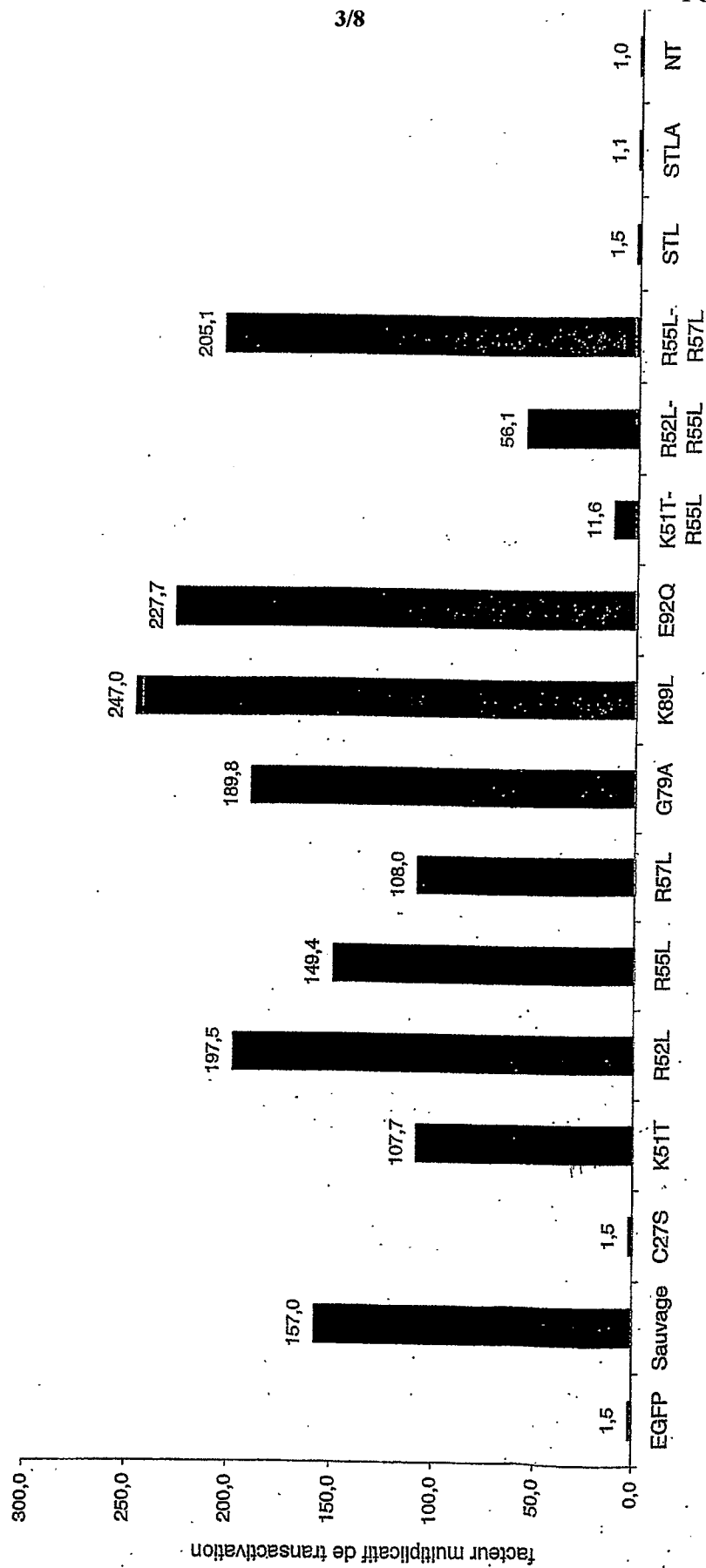


FIGURE 3a

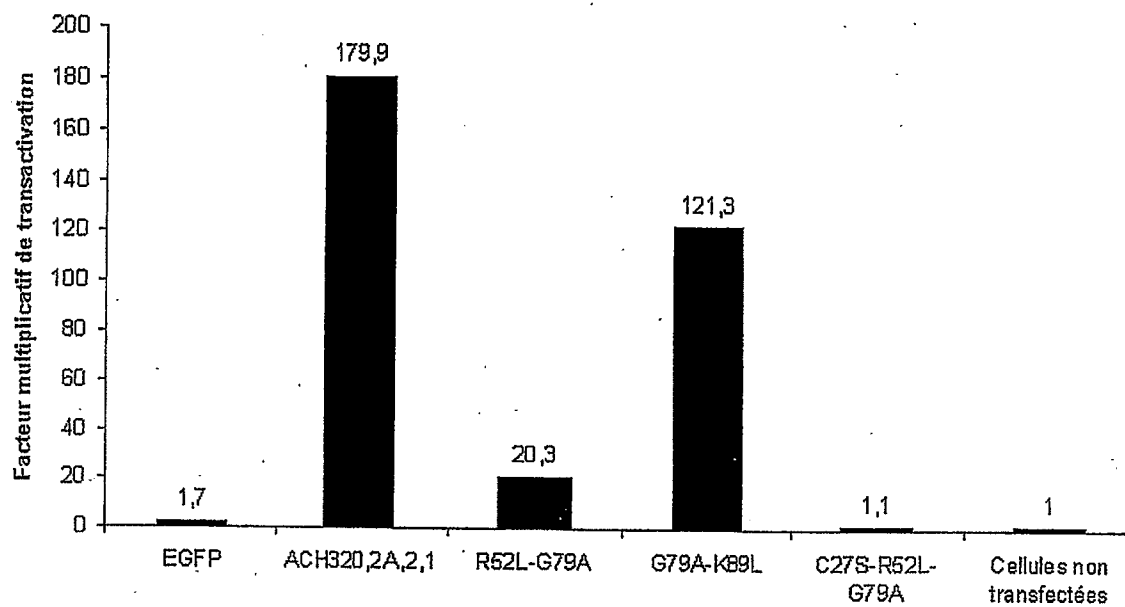


FIGURE 3b

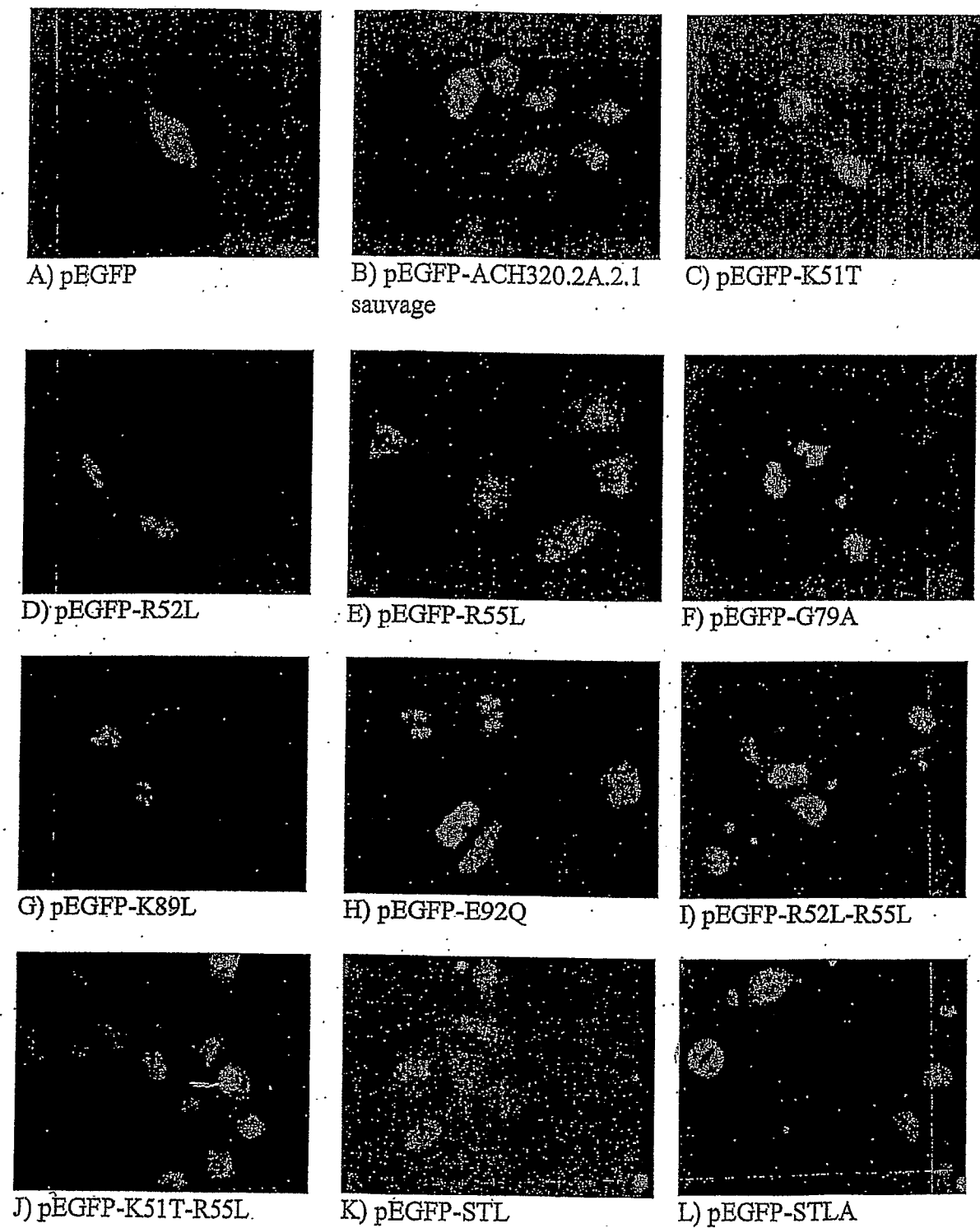
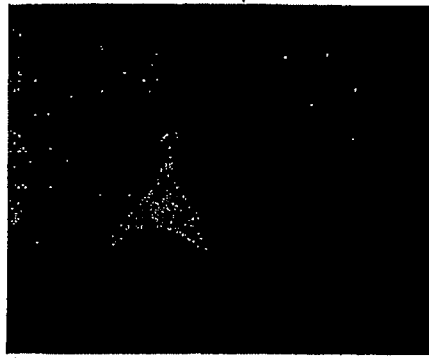
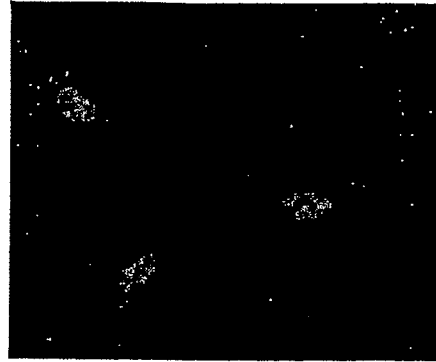


FIGURE 4a



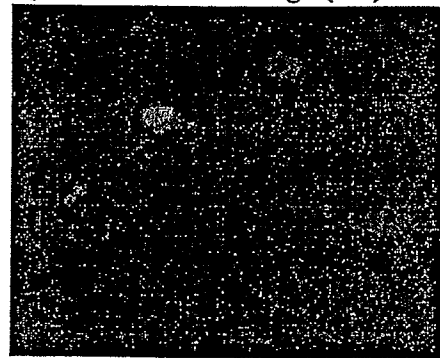
A) EGFP seule



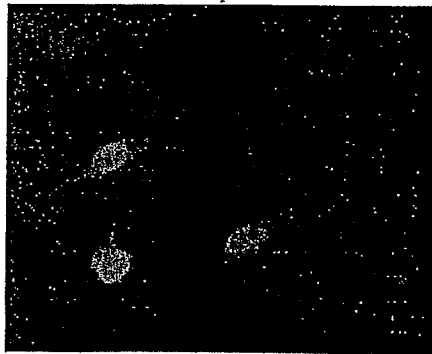
B) EGFP- Tat sauvage (Wt)



C) EGFP-Tat mutant 52-79



D) EGFP- Tat mutant 79-89



E) EGFP- Tat mutant 27-52-79

FIGURE 4b

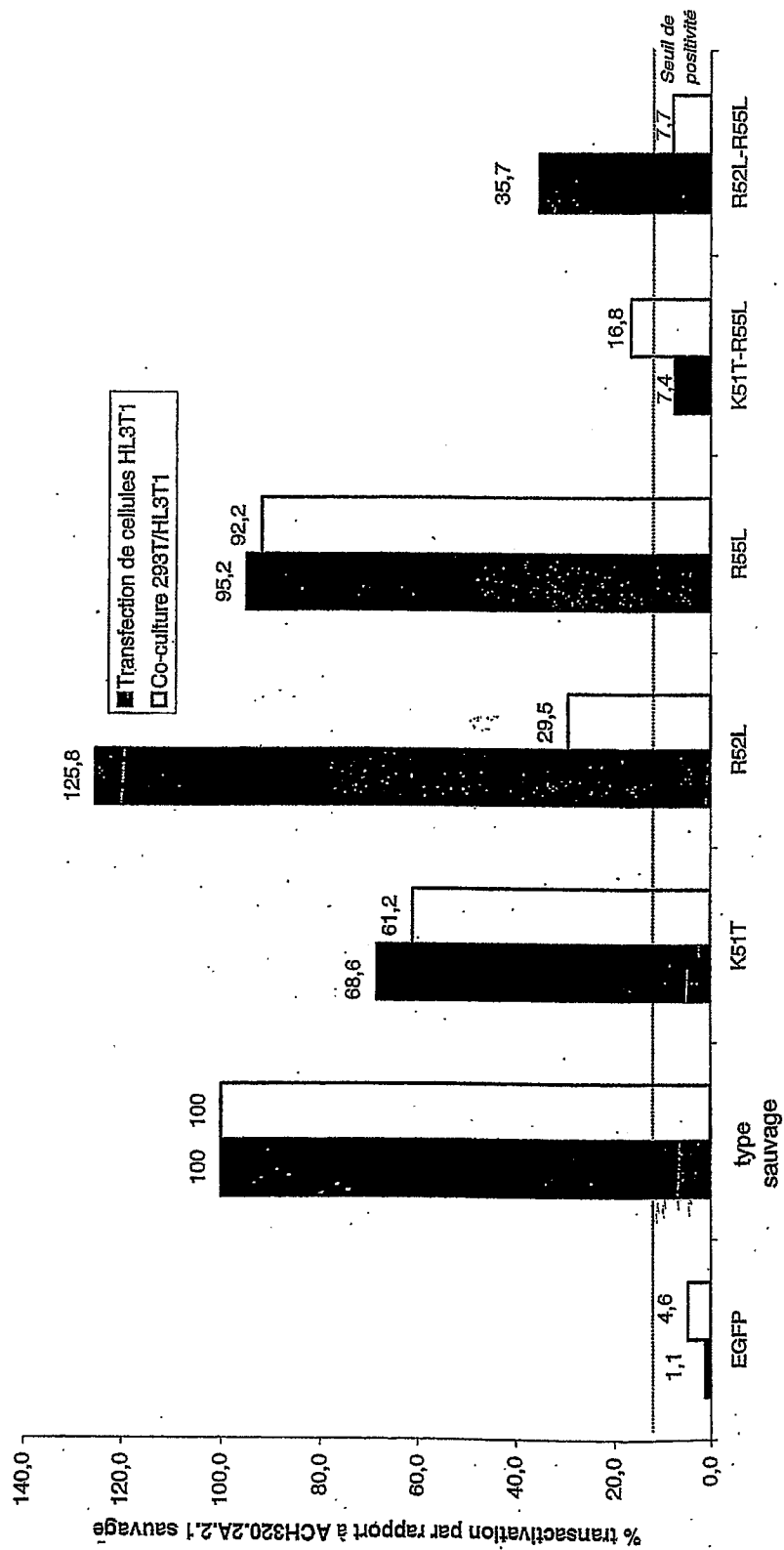


FIGURE 5

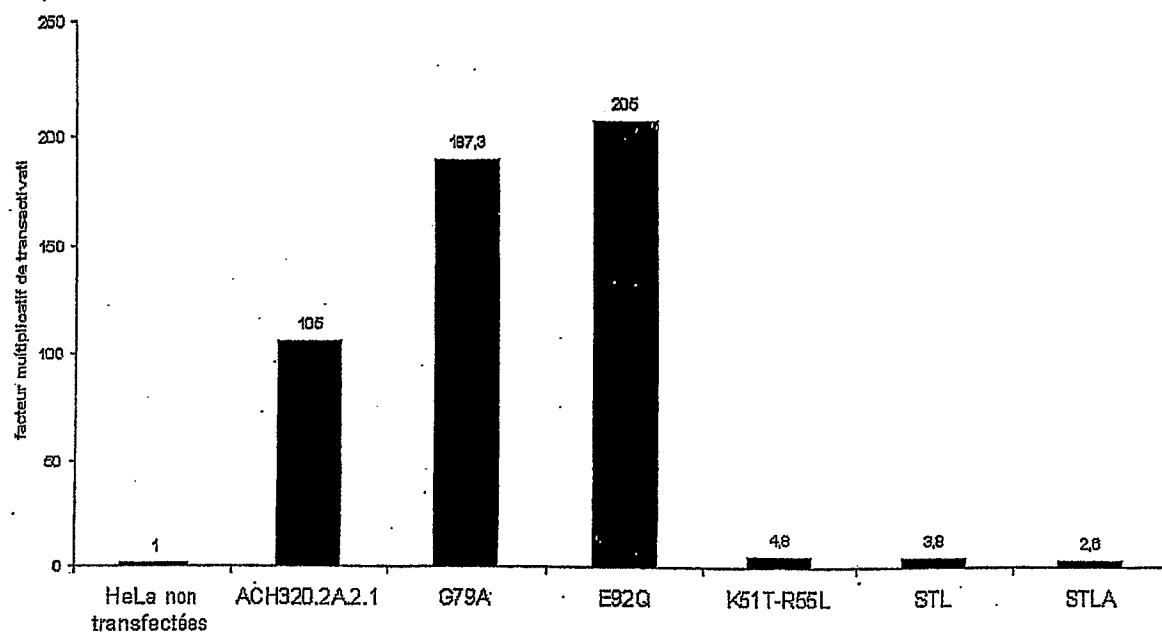


FIGURE 6

| | | |
|---|---|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/49 C12N5/10 C07K14/16 C07K16/10 A61K39/21 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | ORSINI M.J. & DEBOUCK C.M.: "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 Tat function by transdominant Tat protein localized to both the nucleus and cytoplasm" J. VIROL., vol. 70, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 8055-8063, XP002214873 abstract; figure 1 | 1-7, 16-25 |
| X | WO 96 28189 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;BUTEL JANET S (US); CHINEN JAVIER (US); H) 19 September 1996 (1996-09-19) claims 2,4 figure 1 | 1-7, 16-25 |
| --- -/-- | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div> | | |
| ° Special categories of cited documents : | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* & * document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 4 June 2003 | 23/06/2003 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Galli, I | |

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | FR 2 792 204 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 20 October 2000 (2000-10-20) page 2, line 8 - line 29 page 3, line 3 - line 9 page 3, line 25 - line 29 page 5, line 22 - line 29 claims 1,2,6,7 ----- | 1 |
| X | WO 99 27958 A (ENSOLI BARBARA ;IST SUPERIORE SANITA (IT)) 10 June 1999 (1999-06-10) page 36, line 15 - line 31 ----- | 1 |
| A | GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 2, no. 9, September 1996 (1996-09), pages 960-964, XP002129594 ISSN: 1078-8956 the whole document ----- | 1-22 |

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----|----------------------------|---------------------|
| WO 9628189 | A | 19-09-1996 | AU | 5135896 A | 02-10-1996 |
| | | | WO | 9628189 A1 | 19-09-1996 |
| <hr/> | | | | | |
| FR 2792204 | A | 20-10-2000 | FR | 2792204 A1 | 20-10-2000 |
| | | | AU | 3972400 A | 14-11-2000 |
| | | | BR | 0009758 A | 08-01-2002 |
| | | | CA | 2370563 A1 | 19-10-2000 |
| | | | EP | 1169057 A2 | 09-01-2002 |
| | | | WO | 0061067 A2 | 19-10-2000 |
| | | | FR | 2792206 A1 | 20-10-2000 |
| | | | HU | 0200841 A2 | 29-07-2002 |
| | | | JP | 2002541165 T | 03-12-2002 |
| | | | NO | 20014841 A | 27-11-2001 |
| <hr/> | | | | | |
| WO 9927958 | A | 10-06-1999 | IT | RM970743 A1 | 01-06-1999 |
| | | | AU | 2412699 A | 16-06-1999 |
| | | | BR | 9814725 A | 03-10-2000 |
| | | | CA | 2311647 A1 | 10-06-1999 |
| | | | CN | 1283121 T | 07-02-2001 |
| | | | WO | 9927958 A2 | 10-06-1999 |
| | | | EP | 1035865 A2 | 20-09-2000 |
| | | | JP | 2001524531 T | 04-12-2001 |
| | | | PL | 341818 A1 | 07-05-2001 |
| | | | TR | 200001553 T2 | 21-11-2000 |
| <hr/> | | | | | |

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE | | |
| CIB 7 | C12N15/49 G01N33/53 | C12N5/10 G01N33/566 |
| C07K14/16 | C07K16/10 | A61K39/21 |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A61K G01N | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | ORSINI M.J. & DEBOUCK C.M.: "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 Tat function by transdominant Tat protein localized to both the nucleus and cytoplasm" J. VIROL., vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 8055-8063, XP002214873 abrégé; figure 1 | 1-7, 16-25 |
| X | WO 96 28189 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;BUTEL JANET S (US); CHINEN JAVIER (US); H) 19 septembre 1996 (1996-09-19) revendications 2,4 figure 1 | 1-7, 16-25 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe |
| ° Catégories spéciales de documents cités: | | |
| <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
| 4 juin 2003 | | 23/06/2003 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé Galli, I |

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | FR 2 792 204 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 20 octobre 2000 (2000-10-20) page 2, ligne 8 - ligne 29 page 3, ligne 3 - ligne 9 page 3, ligne 25 - ligne 29 page 5, ligne 22 - ligne 29 revendications 1,2,6,7 ----- | 1 |
| X | WO 99 27958 A (ENSOLI BARBARA ;IST SUPERIORE SANITA (IT)) 10 juin 1999 (1999-06-10) page 36, ligne 15 - ligne 31 ----- | 1 |
| A | GOLDSTEIN G: "HIV - 1 Tat protein as a potential AIDS vaccine" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 2, no. 9, septembre 1996 (1996-09), pages 960-964, XP002129594 ISSN: 1078-8956 le document en entier ----- | 1-22 |

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|---|------------------------|---|--------------|------------------------|
| WO 9628189 | A | 19-09-1996 | AU | 5135896 A | 02-10-1996 |
| | | | WO | 9628189 A1 | 19-09-1996 |
| FR 2792204 | A | 20-10-2000 | FR | 2792204 A1 | 20-10-2000 |
| | | | AU | 3972400 A | 14-11-2000 |
| | | | BR | 0009758 A | 08-01-2002 |
| | | | CA | 2370563 A1 | 19-10-2000 |
| | | | EP | 1169057 A2 | 09-01-2002 |
| | | | WO | 0061067 A2 | 19-10-2000 |
| | | | FR | 2792206 A1 | 20-10-2000 |
| | | | HU | 0200841 A2 | 29-07-2002 |
| | | | JP | 2002541165 T | 03-12-2002 |
| | | | NO | 20014841 A | 27-11-2001 |
| WO 9927958 | A | 10-06-1999 | IT | RM970743 A1 | 01-06-1999 |
| | | | AU | 2412699 A | 16-06-1999 |
| | | | BR | 9814725 A | 03-10-2000 |
| | | | CA | 2311647 A1 | 10-06-1999 |
| | | | CN | 1283121 T | 07-02-2001 |
| | | | WO | 9927958 A2 | 10-06-1999 |
| | | | EP | 1035865 A2 | 20-09-2000 |
| | | | JP | 2001524531 T | 04-12-2001 |
| | | | PL | 341818 A1 | 07-05-2001 |
| | | | TR | 200001553 T2 | 21-11-2000 |

